

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462113

研究課題名(和文)新規組織工学による次世代型血管外科再生治療法の開発

研究課題名(英文)Development of vascular regenerative therapy using new tissue engineering

研究代表者

伊藤 学 (Itoh, Manabu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50555084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞凝集現象により形成されるスフェロイドを一つの単位として、細胞のみで任意の立体構造体を構築する組織工学技術を用いた血管再生の研究を進めてきた。ヒト由来血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞を混合した血管組織型スフェロイドを用いて血管様構造体を構築し、胸腺欠損ヌードラットや免疫抑制剤投与下の大動物への短期移植に成功した。組織をバイオリクターで成熟させ、1000mmHg以上の力学的強度(圧力破碎試験)を有する血管様構造体の作製に成功した。長期培養した構造体の病理組織検査にて生体血管に似た層構造を認め、細胞外マトリックス産生(外側)と、内側の一部にCD34陽性血管内皮細胞を確認した。

研究成果の概要(英文)：We generated scaffold-free tubular tissues from multicellular spheroids (MCS) composed of endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts using a new tissue engineering, which were successfully implanted to nude rat and large animal (immunosuppressed mini pig) in an acute study. When the tubular tissues were matured in a perfusion system during more than one month, we confirmed resistance of more than 1000mmHg in the burst. Moreover, a layer structure similar to blood vessel was confirmed upon histopathologic testing and extracellular matrix production (outer side) as well as partial CD34-positive vascular endothelial cells on the inner side were confirmed.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：血管外科 組織工学 再生医療 人工血管

1. 研究開始当初の背景

外来異物を用いて作成した血管は、抗血栓性、抗感染性の面で、自己血管より劣るのは周知であり、未だ臨床に応用できる口径3mm以下の小口径人工血管は存在しない。我が国では生活様式の変化や高齢化に伴って、糖尿病や維持透析患者の虚血性心疾患、末梢動脈疾患といった生命予後に影響する動脈硬化性の血管不全が増加している。心臓の血管を新たに開通させる冠動脈バイパス術は年間20000例も実施されているが、小口径の人工血管が開発されていないために、患者自身の限られた部位の自己血管を取り出して、使用しなくてはならない。また足関節以下の遠位バイパスにおいては、血行再建に用いる適正な自己血管がないために下肢切断を余儀なくされる患者が年々増加しており、外科的血行再建に応用できる新たな人工血管の開発が求められている。我々は、近年、接着系細胞が元来有する基本的機能である細胞凝集現象により、細胞のみで構成される細胞凝集塊 = スフェロイドに着目し、さらにそれを一つの単位として複雑な形状の組織をロボット (スフェロイド自動積層装置 (Bio-3D printer)) にて作製するシステムを開発した。本技術を用いて血管を構築する利点は、2次元培養と比較してスフェロイド形成段階で細胞外マトリックスが生理的に産生されており、より生体に近い機能を発現できること。足場 (Scaffold) としての外来異物を全く含まず細胞のみで組織を構築できること。

さまざまなデザインが可能であり、移植対象の血管径に適合させた任意の口径で作製できること。等が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究目的は、新たな組織工学技術を用いて細胞のみで構築された小口径人工血管 (血管構造体) を作成し、移植後の開存性や血管壁のリモデリング効果を解析するこ

とで、臨床応用の可能性を究明し、次世代型血管外科再生治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

低接着性U字プレートを用いて3次元培養し血管組織型スフェロイドの作製についての条件検討、機能解析を行う。スフェロイド自動積層装置を用いて3次元管状デザインをもとに血管組織型スフェロイドを積層し、血管様構造体を作製する。作製した血管構造体をバイオリアクターにて一定期間循環培養した後に、張力試験や圧力破砕試験などの移植前の力学的機能評価、組織学的機能評価を行う。動物への移植後の生存率、開存率、免疫応答、及び血管壁のリモデリング効果の検討を行う。

4. 研究成果

生体内で血管を構成するヒト由来の血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞を配合 (血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞 = 4:1:5) して血管組織型スフェロイドを作製し、スフェロイド自動積層装置を用いて血管様構造体を作製した。移植時の操作や、移植後生体環境 (圧負荷など) に対応できるように血管様構造体をバイオリアクターで循環培養し、胸腺欠損ヌードラットの腹部大動脈 (口径1~1.5mm) への短期移植に成功した。

血管組織型スフェロイドの中に混合する線維芽細胞がコラーゲン産生の促進、血管様構造体強度維持に影響する結果を得た。In vitro での構造体の力学的強度を向上させる目的で、混合する線維芽細胞の比率を上げ、かつ循環培養の期間延長、培地成分、成熟方法の改良により、1000mmHg以上 (ヒト正常血圧の約8倍程度) の圧力破砕強度があることを確認した。またさらにバイオリアクター内で構造体同士の連結に成功し、長軸方向へ延長した任意の口径、長さの血

管構造体の作製が可能となった。約1か月の循環培養後の病理組織検査にて、生体血管に似た層構造を認め、細胞外マトリックス産生(外側)と、内側の一部にCD34陽性血管内皮細胞を確認した。心臓・血管臓器の解剖学的形態がヒトと近似したミニブタ(免疫抑制剤投与下)への短期移植に成功した。長期的なデータを得るためにはヒト-ミニブタ間での免疫拒絶のコントロールも重要となるが、今後さらに血管様構造体の構築法、成熟方法を改良することで、移植後のより長期的な検証へと発展させたい。本研究のように外来異物を全く含まず、細胞のみで3次元的な組織を造る技術を利用した治療の報告は少なく、自己組織での臓器再生・移植モデルが確立されれば、免疫応答、感染の危険性を回避できる次世代の治療モデルの確立につながると考えている。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- 1) 伊藤 学, 中山功一, 五條理志, 野出孝一, 森田茂樹 バイオ3Dプリンティング技術を利用した scaffold free 小口径細胞人工血管の開発. 血管医学. 17(1): 63-68 2016 (査読無)
- 2) Noguchi R, Nakayama K, Itoh M, Kamohara K, Furukawa K, Oyama J, Node K, Morita S. Development of a Three-Dimensional Prevascularized Scaffold-Free Contractile Cardiac Patch for Treating Heart Disease. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 35(1): 137-45 2016 (査読有)
- 3) Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, Kamohara K, Furukawa K, Uchihashi K, Toda S, Oyama J, Node K, Morita S. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. PLoS One. 10(9): e0136681, 2015 (査読有)
- 4) 伊藤 学, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹 バイオ3Dプリンターで立体造形した Scaffold Free の血管組織構築. 最新医学 70(8): 79-86, 2015 (査読有)

[学会発表](計4件)

- 1) Verissimo A.R, Nakamura A, Matsubayashi K, Itoh M, Nakayama K. Bio 3D printing scaffold-free blood vessels. 2016 Joint Annual Scientific Meeting of The Australian Atherosclerosis Society 2016.12.7-11 (Hobart, Tasmania)
- 2) Mukae Y, Itoh M, Furukawa K, Kitsuka T, Arai K, Oyama J, Nakayama K, Node K, Morita S. Addition of human iPS-derived neural progenitors influences the contractile function of cardiac spheroids. Biofabrication 2016 Conference 2016.10.29-31 (Winston-Salem, N.C.)
- 3) 伊藤 学, 迎 洋輔, 古川浩二郎, 松林久美香, 高岡勇輝, 上 大介, 五條理志, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹 血管外科領域におけるバイオ3Dプリンターで造形した血管組織の有用性 第15回日本再生医療学会総会 2016.3.17-19 (大阪)

- 4) 迎 洋輔, 伊藤 学, 古川浩二郎, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞凝集塊の機能的解析. 第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会 2015.10.19 (神戸)
- 5) Itoh M, Mukae Y, Matsubayashi K, Kawakatsu M, Furukawa K, Uchihashi K, Toda S, Oyama J, Node K, Nakayama K, Morita S. The effectiveness of using a bio-3D printer in the development of a scaffold-free regenerative vascular graft. 2015 4th TERMIS World Congress 2015.9.8-11(Boston)
- 6) 伊藤 学
バイオ 3D プリンターを用いた臓器再生
第 76 回日本臨床外科学会総会
2014.11.20-22 (仙台)
- 7) Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, Kamohara K, Furukawa K, Uchihashi K, Toda S, Oyama J, Node K, Morita S. Implantation of Scaffold-Free Tubular Tissue Using a Bio-3D Printer Augments Vascular Remodeling and Endothelialization. American Heart Association SCIENTIFIC SESSIONS 2014.11.17 (Chicago)
- 8) 伊藤 学, 野口 亮, 山元博文, 佐藤久, 諸隈宏之, 柚木純二, 蒲原啓司, 古川浩二郎, 中山功一, 尾山純一, 野出孝一, 森田茂樹 新規組織工学技術による次世代型小口径人工血管の開発
第 42 回日本血管外科学会学術総会
2014.5.21-23 (青森)

6 . 研究組織

- (1) 研究代表者
伊藤 学 (Itoh Manabu)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号 : 50555084
- (2) 研究分担者
迎洋輔 (Mukae Yousuke) (2106 年 4 月追加)
佐賀大学・医学部・医員
研究者番号 : 90746570
- 中山功一 (Nakayama Kouichi)
佐賀大学・医学部・寄付講座教授
研究者番号 : 50420609
- 野出孝一 (Node Kouichi)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号 : 80359950
- 森田茂樹 (Morita Shigeki)
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号 : 70243938
- 野口亮 (Noguchi Ryo) (2016 4 月削除)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号 : 70530187